# ハイスピードフローサイトメーター CyAn™ ADPを用いた酵母生存率の測定

## はじめに

酵母などの微生物は、遺伝子工学やワクチン開発、食品製造など、多くのバイオテクノロジー用途で利用されています。これらのアプリケーションの多くにとって、培養液中の細胞の生存率は重要です。従来、保存培養液中の生存率確認には、顕微鏡を用いた血球計算盤によるマニュアル法が用いられてきました（Smartら、1999年）。しかし、この方法は手間と時間がかかり、得られる結果は主観的で、計測者の訓練や経験のレベルに左右されます。これに比べ、フローサイトメトリーによる測定は簡便かつ正確です。最大で1秒当たり細胞50,000個という迅速測定をも可能にします。フローサイトメトリー法を用いることで、醸造など発酵プロセスの管理が必要な大量生産用途において、リアルタイムで、迅速かつ正確なデータが得られます。以下に、酵母*Saccharomyces cervisiae* を対象としたCyAn ADPによる2種類の酵母生存率測定方法を紹介します。

## 材料と方法

### 細胞調製と染色

方法1では、インビトロジェン社のLIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Kits.*を用いて酵母生存率を評価しました。方法2では、インビトロジェン社のFUN®1 cell stain*を用いて生存率を評価しました。どちらの方法においても、酵母（*Saccharomyces cervisia*）は、YPD Broth（yeast extract、peptone、extrose）で24～48時間（25℃）培養しました。コントロール用の死細胞は、70℃の熱処理で調製しました。

BacLight Bacterial Kits.はSYTO 9とヨウ化プロピジウム（PI）の2種類の核酸染色試薬で構成されています。SYTO 9は細胞膜透過性の染色試薬で、488nmで励起され最大蛍光波長は498nmです。PI（励起波長488nm、最大蛍光波長630nm）は、生細胞の膜は透過しない染色試薬で、膜が損傷している死細胞が染色されます。適切な蛍光色素試薬の比率で染色した場合、この2種類の染色試薬で染色された細胞は、蛍光顕微鏡下で生きている細胞は明るい緑色（498nm）を、膜に損傷のある細胞（死細胞または死につつある細胞）は赤色（630nm）の蛍光を発します。

培養した酵母は10,000×gで5分間遠心しました。得られたペレットをPBSに再懸濁し、濃度を$1\times10^6$cells/mLとしました。BacLight Bacterial Kits.の取扱説明書に従い、PBSに最終濃度100μmol/LのSYTO 9と600μmol/LのPIになるよう溶液を調製します。この溶液と酵母懸濁液を体積比1：1で混合し、室温暗所で10分間静置後、サンプルをフローサイトメーターで測定しました。

FUN1は膜透過性核酸結合性色素で、生細胞と死細胞の両方を染色し、488nmで励起すると緑色（530nm）の明るい蛍光を発します。しかし、適切なインキュベーション後、細胞内の代謝により、色素は赤橙色の蛍光物質に変換されます。この代謝的変換は細胞内のCylindrical Intra Vacuolar Structures（CIVS）で起こります。CIVSは蛍光顕微鏡で簡単に識別できますが、フローサイトメーターによるCIVSの検出は困難です。しかし、生細胞でCIVSが形成されると明るい530nmの蛍光が失われるため、この530nmの蛍光を発したままである生存不能細胞と明確に区別することが可能です。細胞懸濁液は10,000×gで5分間遠心しました。得られたペレットをグルコースHEPES溶液（2％のD-(+)-グルコース、10μmol/L Na-HEPESを含む、pH 7.2、0.2μmフィルタ濾過済み）に再懸濁し、濃度を$1\times10^7$cells/mLとしました。酵母懸濁液に5μmol/Lの色素を添加し、30℃で30分間インキュベーション後、解析を行いました。

## 結果

どちらの方法でも、CyAn ADPは、標準フィルタでレーザ励起波長を488nmとしデータ取得を行いました。酵母細胞集団は前方拡散光（FS Log） vs. 側方拡散光（SS Log）ドットプロットで検出し、ゲーティングしました（Figure 2a）。

BacLightキットで染色された生細胞／死細胞集団は、SYTO 9（Log FL1）vs. PI（Log FL3）ドットプロット（Figure 1a）または、SYTO 9 (Log) vs. 側方散乱光(Log)ドットプロット（Figure 1b）で検出できます。

FUN1で染色した酵母の生細胞と死細胞は、FUN1（Log FL1） vs. 側方散乱光(Log)ドットプロット（Figure 2b）で示されています。

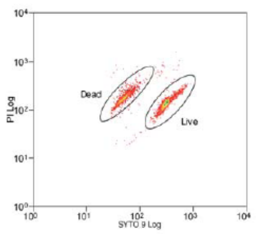

Figure 1a

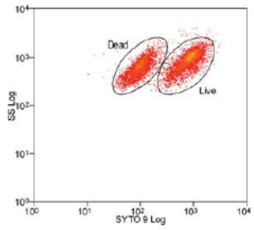

Figure 1b

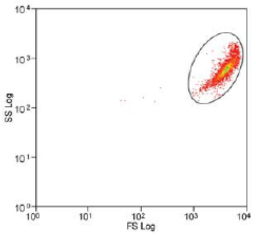

Figure 2a

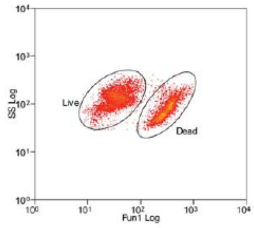

Figure 2b

## 考察

このアプリケーションノートで示したようなBacLightキットで染色した酵母培養液のフローサイトメトリーによる生存率評価は、従来のメチレンブルー染色による顕微鏡下計数法と比較し、1.4%異なる結果とされています（Zhang ら、2004年）。

BacLightとFUN1を比較すると、CyAn ADPで分析した場合、生細胞／死細胞集団の比率の違いは1%以内でした。

BacLightキットはFUN1よりも速く結果が得られます。一方、FUN1法は染色剤が1種類であるため、調製や分析が簡単です。

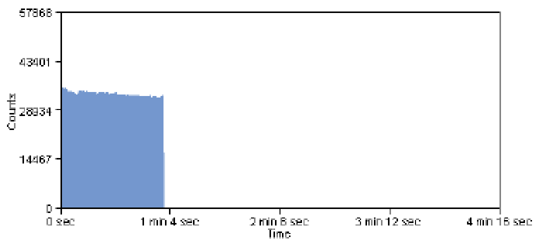

Figure 5

サンプル測定速度は、33,000細胞/秒以上です。このアプリケーションは、高速解析が可能です。59秒でトータル1,947,429イベント（33,000イベント/秒）測定できます。

## ヒント

1. 酵母のような小さな粒子を計測する際は、散乱光のパラメータはlogに設定してください。サイズ較正用粒子の測定は、電圧調整が行いやすくなります。バッファ溶液のみを測定して「ノイズ」を確認してください。バッファで生じる「ノイズ」を減らすには、ゲーティングを行うか、Threshold値を大きくします。側方散乱光にThresholdを設定することで、ノイズを減らすこともできます。

2. ドットプロットにおいて生細胞と死細胞の分離が良くない場合、サンプルを顕微鏡で観察して正しく染色されているかを確認してください。例えば、インキュベーション条件やFUN1色素の細胞内浸透が適切でないと、CIVSの形成が妨げられ、生細胞にも緑色の蛍光が残ることがあります。

3. SYTO 9を用いて測定を行った後は、その後のサンプルに混入のおそれがあるため、フローサイトメーターのサンプルインジェクション系を十分に洗浄してください。洗浄は4mLの70%エタノールをacquire modeで流すすることをお勧めします（流速を上げることでこの洗浄プロセスをスピードアップできます）。正しく洗浄できたかを確認するには、実験前に8 Peak FluoroSphereなどのlog較正用ビーズを測定し、洗浄後に再度測定することをお勧めします。最初および最後のピークにリージョンを設定し、これらが洗浄サイクル後も同一であることを検証してください。さらにエタノール洗浄が必要な場合は、新しい較正用ビーズを用いて再度確認してください。

## 参考文献


1. Smart K, Chambers, KM, Lambert I, Jenkins C. 1999. Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality. Am. Soc. Brew. Chem. 57(1):18–23.

2. Zhang T & Fang HHP. 2004. Quantification of Saccharomyces cerevisiae viability using BacLight. Biotechnology Letters 26: 989–992.



Beckman Coulter、Beckman CoulterロゴおよびCyAnは、Beckman Coulter, Inc.の商標です。
LIVE/DEAD BacLight Viability KitsおよびFUN1は、インビトロジェン社の登録商標です。



ベックマン・コールター株式会社　本 社：〒135-0063 東京都江東区有明2-5-7 TOC有明ウエストタワー
お客様専用 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460 e-mail bckkcas@beckman.com URL http://www.beckmancoulter.co.jp